

Patent Number: WO0050904

Publication
date: 2000-08-31

Inventor(s): TURECEK PETER (AT); VARADI KATALIN (AT); SCHWARZ HANS-PETER (AT);
SIEKMANN JUERGEN (AT); FURLAN MIHA (CH); GERRITSEN HELENA E (CH);
LAEMMLE BERNHARD (CH)

Applicant(s): BAXTER AG (AT); TURECEK PETER (AT); VARADI KATALIN (AT); SCHWARZ HANS
PETER (AT); SIEKMANN JUERGEN (AT); FURLAN MIHA (CH); GERRITSEN HELENA E
(CH); LAEMMLE BERNHARD (CH)

Requested
Patent: WO0050904

Application
Number: WO2000AT00049 20000223

Priority Number
(s): AT19990000132.19990225

IPC
Classification: G01N33/86; C12Q1/37

EC
Classification:

Equivalents: AU3133600, AU756563, CA2362483, EP1155328 (WO0050904), A1

Cited
Documents: AT403853B; WO9741206

Abstract

The invention relates to a test kit for analysing the von Willebrand factor-splitting protease and for carrying out differential diagnosis between patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and patients with haemolytic-uraemic syndrome. Said test kit consists of a standard von Willebrand factor preparation which is free of von Willebrand factor-splitting activity, as a substrate for the von Willebrand factor-splitting activity in a sample or in the patient plasma, and a system for quantitatively determining the bonding of von Willebrand factor to collagen. The invention also relates to a method for detecting an acquired or congenital deficiency of von Willebrand factor-splitting protease.

Data supplied from the **esp@cenet** database

BEST AVAILABLE COPY

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 33/86, C12Q 1/37		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/50904
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT00/00049		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 31. August 2000 (31.08.00)	
(22) Internationales Anmeldedatum: 23. Februar 2000 (23.02.00)		(81) Bestimmungsstaaten: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Prioritätsdaten: GM 132/99 25. Februar 1999 (25.02.99) AT		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT [AT/AT]; Industriestrasse 67, A-1221 Wien (AT).			
(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GERRITSEN, Helena, E. [CH/CH]; Steinhölzliweg 75, CH-3007 Bern (CH). FURLAN, Miha [CH/CH]; Liebeggweg 7, CH-3006 Bern (CH). TURECEK, Peter [AT/AT]; Hauptstrasse 59g, A-3400 Kolsterneuburg Weidling (AT). VARADI, Katalin [HU/AT]; Othelloasse 1/6/2, A-1230 Wien (AT). SIEK-MANN, Jürgen [DE/AT]; Gerasdorfer Strasse 153/209, A-1210 Wien (AT). LÄMMLE, Bernhard [CH/CH]; Schützenweg 3, CH-3065 Bolligen (CH). SCHWARZ, Hans-Peter [AT/AT]; Schindlergasse 32, A-1180 Wien (AT).			
(74) Anwälte: SONN, Helmut usw.; Riemergasse 14, A-1010 Wien (AT).			

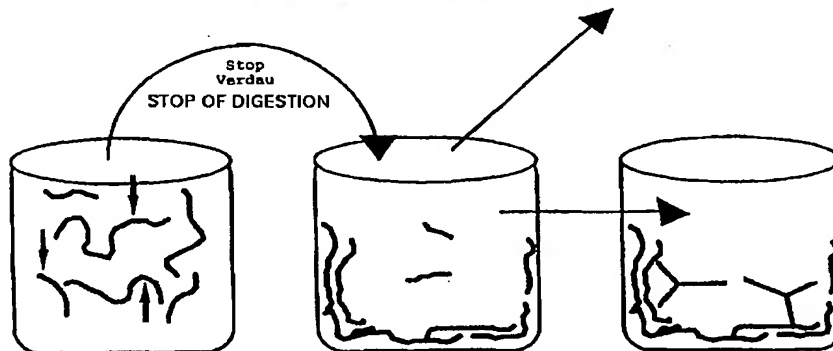
(54) Title: TEST KIT FOR ANALYSING FACTOR VIII-SPLITTING PROTEASE

(54) Bezeichnung: TESTKIT ZUR ANALYTIK DER FAKTOR-VIII-SPALTENDEN PROTEASE

(57) Abstract

The invention relates to a test kit for analysing the von Willebrand factor-splitting protease and for carrying out differential diagnosis between patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and patients with haemolytic-uraemic syndrome. Said test kit consists of a standard von Willebrand factor preparation which is free of von Willebrand factor-splitting activity, as a substrate for the von Willebrand factor-splitting activity in a sample or in the patient plasma, and a system for quantitatively determining the bonding of von Willebrand factor to collagen. The invention also relates to a method for detecting an acquired or congenital deficiency of von Willebrand factor-splitting protease.

COLLAGEN BINDING ASSAY TO THE VON WILLEBRAND
FACTOR-SPLITTING PROTEASE
Collagen-Bindungassay der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease



1) Verdau von vWF in
Protease-inaktiviertem
Plasma durch die Pro-
tease des Testplasmas

1) DIGESTION OF vWF IN
PROTEASE-INACTIVE
PLASMA BY PROTEASE
OF THE TEST PLASMA

2) Bindung des vWF
an die collagen-
beschichtete
Oberfläche

2) BINDING THE vWF TO
THE COLLAGEN-COATED
SURFACE

3) Bestimmung des
gebundenen vWF

3) DETERMINING THE
BOUND vWF

(57) Zusammenfassung

Beschrieben wird ein Testkit zur Analytik der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease und zur Differentialdiagnostik zwischen Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura und Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom, bestehend aus einer von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktor-spaltender Aktivität ist, als Substrat für die von Willebrand Faktor-spaltende Aktivität in einer Probe oder im Patientenplasma und einem System zur quantitativen Bestimmung der Bindung von von Willebrand Faktor an Collagen, sowie ein Verfahren zum Nachweis eines erworbenen oder kongenitalen Mangels der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

TESTKIT ZUR ANALYTIK DER FAKTOR-VIII-SPALTENDEN PROTEASE

Die vorliegende Erfindung betrifft einen Testkit und ein Verfahren zur Bestimmung der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease sowie die Anwendung des Verfahrens zur Differentialdiagnostik der thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) und des hämolytisch-urämischen Syndroms (HUS).

Mangel an von Willebrand Faktor-spaltender Protease wurde bei Patienten mit TTP festgestellt, während Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom (HUS) eine normale Aktivität der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease aufwiesen. Abgesehen von den bisher bereits beschriebenen verschiedenen aufwendigen Verfahren (Blood 1996; 87:4223) ist zur Zeit kein Bestimmungsverfahren der Aktivität der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease verfügbar. Ein einfaches Bestimmungsverfahren würde die Unterscheidung zwischen TTP und HUS erleichtern und so ein besseres Monitoring der Therapie von Patienten mit TTP erlauben.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass ein Testkit, bestehend aus einer von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktor-spaltender Aktivität ist, als Substrat für die von Willebrand Faktor-spaltende Aktivität in einer Probe oder im Patientenplasma und einem System zur quantitativen Bestimmung der Bindung von von Willebrand Faktor an Collagen die Analytik der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease und die Differentialdiagnostik zwischen Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura und Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom erstmals auf einfache Weise ermöglicht. Die von Willebrand Faktor-Standardpräparation kann dabei sowohl spezifisch hinsichtlich von Willebrand Faktor-spaltender Protease inaktiviert sein, es kann dabei aber ebenso eine generell Protease-inaktivierte von Willebrand Faktor-Standardpräparation verwendet werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Testkits erfolgt die quantitative Bestimmung der Collagen-Bindungsaktivität an immobilisiertem aviden Collagen, welches vorzugsweise an eine Mikrotiterplatte gebunden vorliegt.

Günstig ist dabei, wenn das immobilisierte Collagen kovalent gebunden ist.

Weiters ist dabei vorteilhaft, wenn das avide Collagen ein enzymatisch abgebautes, lösliches, humanes Collagen ist.

Vorzugsweise ist die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein humanes Referenzplasma, bei welchem die von Willebrand Faktorspaltende Proteaseaktivität inaktiviert ist.

Gemäß noch einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, dass die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein rekombinanter von Willebrand Faktor ist.

Günstig ist auch, wenn die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein von Willebrand-Faktor-Dimer ist.

Weiters betrifft die vorliegende Erfindung auch noch ein Verfahren zum Nachweis eines erworbenen oder kongenitalen Mangels der von Willebrand Faktorspaltenden Protease, wobei eine von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktorspaltender Aktivität ist, als Substrat mit der von Willebrand Faktorspaltenden Aktivität des Patientenplasmas oder Verdünnungen desselben in Kontakt gebracht wird und nach Inkubation die quantitative Detektion des residualen von Willebrand Faktors durch seine Bindungseigenschaften an Collagen erfolgt.

Die beiliegenden Abbildungen zeigen das erfindungsgemäße Testprinzip und die Anwendung zur Diagnostik von Patientenplasmen. Die Übereinstimmung der komplizierten SDS-Agarose gelelektrophoretischen Qualifizierung mit anschließendem Immunblotting mit der quantitativen Methode des erfindungsgemäßen Collagen-Bindungstests (CBA) ist ebenfalls in den beiliegenden Abbildungen dargestellt.

Erfindungsgemäß wurden Verdünnungen von Patienten- und Normalplasmen mit Barium aktiviert und mit unverdünntem vWF-Substrat versetzt. Als Substrat wurde ein Protease-inaktiviertes Plasma benutzt. Nach zwei Stunden Verdauung in Anwesenheit von Urea

wurde die Reaktion gestoppt und das Inkubationsgemisch auf eine ELISA-Platte gegeben, die zuvor mit Collagen beschichtet worden war. Die langen vWF-Multimere binden sehr stark an das Collagen, die kleinen Moleküle kaum oder gar nicht. Der Überstand wird so- dann verworfen und die vWF-Moleküle, die an das Collagen gebun- den wurden, können mittels allgemein bekannter Verfahren des Standes der Technik detektiert werden, z.B. mit Hilfe Peroxida- se-markierter Antikörper angefärbt werden.

Die vorliegende Erfindung wird nun unter Bezugnahme auf die bei- liegenden Abbildungen näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1 das Prinzip des erfindungsgemäßen Kollagen-Bindungstests,

Fig. 2 die Wirkung der Protease mit vWF-spaltender Aktivität,

Fig. 3 die Wirkung der Protease mit vWF-spaltender Aktivität auf die vWF-Untereinheit,

Fig. 4 die Testkalibrierung,

Fig. 5 die Bestimmung der vWF-spaltenden Protease in Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura,

Fig. 6 die Bestimmung der vWF-spaltenden Protease in einem Pa- tienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura während der therapeutischen Behandlung, und

Fig. 7 die quantitative Bestimmung der vWF-spaltenden Protease in gereinigten Plasmafraktionen.

In dem erfindungsgemäßen Test (Fig. 1) wird die unterschiedliche Affinität der verschiedenen langen vWF-Multimere ausgenützt. Die langen Multimere haben eine sehr hohe Affinität zu Collagen, während die kleinen Moleküle keine oder nur geringe Affinität aufweisen.

Der vWF besteht aus verschiedenen langen Multimeren derselben Untereinheit. Die Untereinheiten sind jeweils an den Carboxy- und an den Aminotermi durch Disulfidbrücken miteinander verbunden (Fig. 2). Jede Untereinheit kann bei Tyrosin⁸⁴²-Methionin⁸⁴³ durch die vWF-Protease gespalten werden (Fig. 3).

Unter diesen Bedingungen wurde mit verschiedenen Normalplasma-verdünnungen eine Eichkurve erstellt (Fig. 4). Auf der Y-Achse ist die Extinktion bei 492 nm aufgetragen, auf der X-Achse die Normalplasmaverdünnungen. Es wird angenommen, dass eine Verdünnung von Normalplasma von 1/20 einer Aktivität von 100% entspricht. Je mehr vWF-spaltende Protease im Gemisch vorhanden ist, desto stärker wird der vWF verdaut, desto weniger kann er an Collagen binden und um so kleiner wird die Extinktion.

In Fig. 5 sind die Untersuchungen an zwei Familien dargestellt, deren Mitglieder an hereditärer TTP leiden. Oben ist die Immunblotting-Methode, unten die Werte, die mit dem erfindungsgemäßen Collagen-Bindungsassay (CBA) erhalten wurden, dargestellt. Ganz links ist der Propositus, der homozygot defizient an vWF-spaltender Protease ist. Als nächster kommt der Bruder, ebenfalls homozygot defizient, die Schwester normal, beide Eltern obligatorisch heterozygot. Dort, wo man in der Immunblotting-Methode einen stark verdauten vWF sieht, erhielt man auch im erfindungsgemäßen CBA einen Wert um 100%, dort wo das Substrat nicht verdaut wurde, konnte auch im erfindungsgemäßen CBA keine Aktivität festgestellt werden. Rechts sind Mitglieder derselben Familie, die alle homozygot defizient sind.

Außerdem wurden auch Plasmen eines Patienten mit hereditärer TTP während der Therapie mit FFP untersucht (Fig. 6). Oben ist wiederum die Immunblotting-Methode, unten sind die Werte, die mit dem erfindungsgemäßen CBA erhalten wurden, zu sehen. Ganz links ist eine Plasmaprobe aufgeführt, die vor der Therapie entnommen wurde. Die weiteren Proben sind nach einem ersten und einem zweiten Plasmaaustausch entnommen worden. Sowohl bei der Immunblotting-Methode als auch bei dem erfindungsgemäßen Collagen-Bindungsassay kann eine Zunahme der Aktivität nach dem ersten Austausch, ein weiterer Anstieg nach der zweiten und danach eine Abnahme der Aktivität beobachtet werden.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass es möglich ist, mit Hilfe des erfindungsgemäßen Collagen-Bindungsassays die Aktivität der vWF-spaltenden Protease auf einfache und schnelle Weise zu messen. Dadurch sollte die Diagnose und das Therapiemonitoring von Patienten mit TTP erleichtert werden.

Der Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Möglichkeit zur quantitativen Auswertung und die einfachere und vor allem kürzere Durchführbarkeit, die in der Akutdiagnostik der lebensbedrohlichen Krankheitsbilder von entscheidender Bedeutung ist. Eine besonders vorteilhafte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Tests verwendet zur quantitativen Bestimmung des Protease-substrates von von Willebrand Faktor den Collagen-Bindungsassay gemäß AT 403 853.

Eine weitere Anwendung der vorliegenden Erfindung besteht in der quantitativen Bestimmung der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease bei der Reinigung und Charakterisierung als therapeutische Plasmafraktion oder zur Qualitätskontrolle von therapeutisch eingesetzten Vollplasmen. Dies wird durch das nachfolgende Beispiel (siehe Fig. 7) näher erläutert:

Die von Willebrand Faktor-spaltende Protease (Multimerase) wurde gemäß AT 404 359 teilweise gereinigt. Zur weiteren chromatographischen Reinigung wurde die Multimerasepräparation auf eine Säule, gefüllt mit Fractogel® TSK AF-Orange (Merck), aufgetragen und mit einem Puffergradienten von pH 5,5 - pH 8,5 in einem Trispuffer (10 mM Tris, 10 mM Na₃Citrat, 150 mM NaCl) eluiert. In den Fraktionen wurde die UV-Absorption bei 280nm (Gesamtprotein) und die Collagen-Bindungsaktivität eines von Willebrand Faktor-Standards nach erfindungsgemäßer Inkubation mit den Fraktionen gemessen. Der Kehrwert der Collagen-Bindungsaktivität wurde in das Elutionsdiagramm eingetragen und zeigt, dass neben einem Teil der Proteaseaktivität, die sich im Säulendurchlauf (Fraktion 10-20) befindet, der Großteil der Aktivität zwischen Fraktion 33 und 38 eluiert werden konnte.

P a t e n t a n s p r ü c h e:

1. Testkit zur Analytik der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease und zur Differentialdiagnostik zwischen Patienten mit thrombotisch thrombozytopenischer Purpura und Patienten mit hämolytisch-urämischem Syndrom, bestehend aus einer von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktor-spaltender Aktivität ist, als Substrat für die von Willebrand Faktor-spaltende Aktivität in einer Probe oder im Patientenplasma und einem System zur quantitativen Bestimmung der Bindung von von Willebrand Faktor an Collagen.
2. Testkit gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die quantitative Bestimmung der Collagen-Bindungsaktivität an immobilisiertes avides Collagen erfolgt, welches vorzugsweise an eine Mikrotiterplatte gebunden vorliegt.
3. Testkit nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass das immobilisierte Collagen kovalent gebunden ist.
4. Testkit nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, dass das avide Collagen ein enzymatisch abgebautes, lösliches, humanes Collagen ist.
5. Testkit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein humanes Referenzplasma ist, bei welchem die von Willebrand Faktor-spaltende Proteaseaktivität inaktiviert ist.
6. Testkit gemäß einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein rekombinanter von Willebrand Faktor ist.
7. Testkit gemäß Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die von Willebrand Faktor-Standardpräparation ein von Willebrand Faktor-Dimer ist.
8. Verfahren zum Nachweis eines erworbenen oder kongenitalen Mangels der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease, dadurch

gekennzeichnet, dass eine von Willebrand Faktor-Standardpräparation, die frei von von Willebrand Faktor-spaltender Aktivität ist, als Substrat mit der von Willebrand Faktor-spaltenden Aktivität des Patientenplasmas oder Verdünnungen desselben in Kontakt gebracht wird und nach Inkubation die quantitative Detektion des residualen von Willebrand Faktors durch seine Bindungseigenschaften an Collagen erfolgt.

Fig. 1: Collagen-Bindungassay der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease

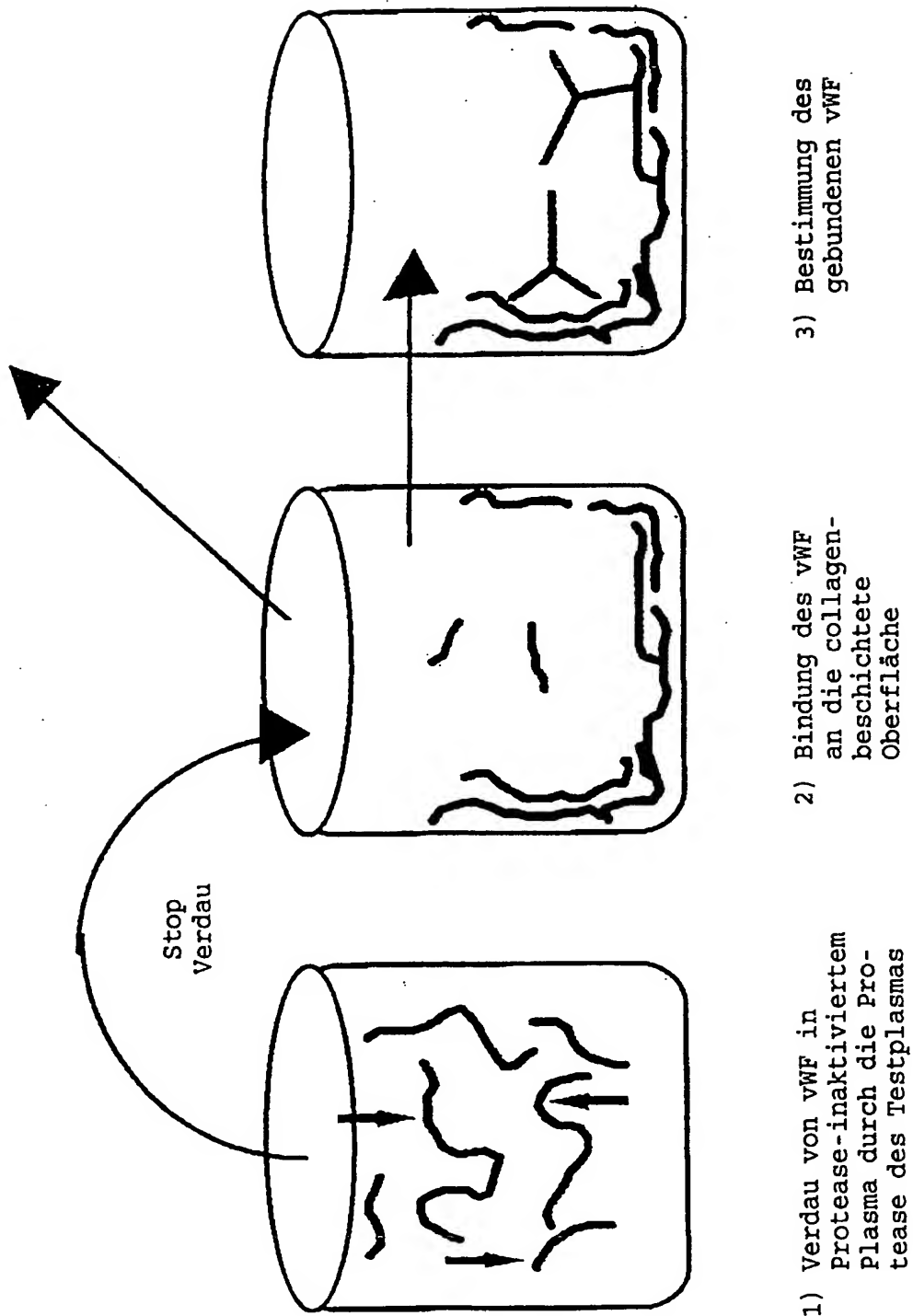


Fig. 2: Spaltung der vWF-Multimeren

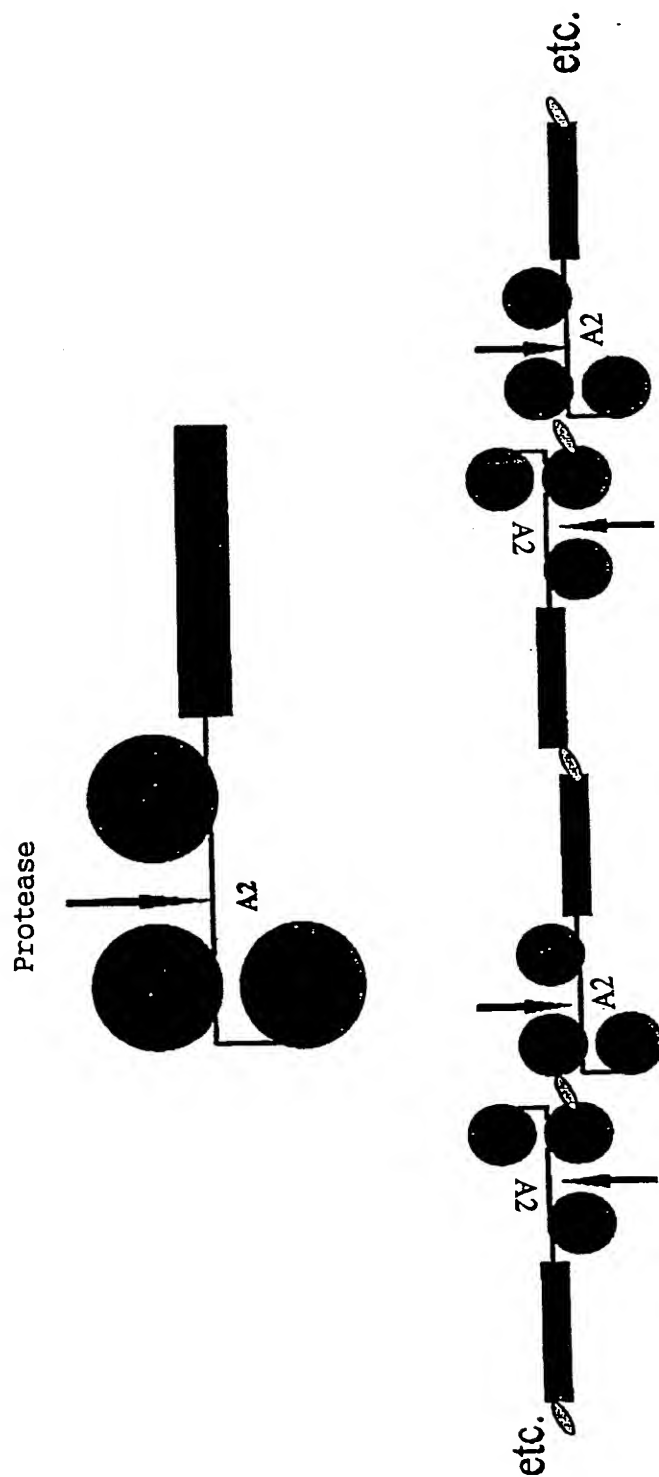
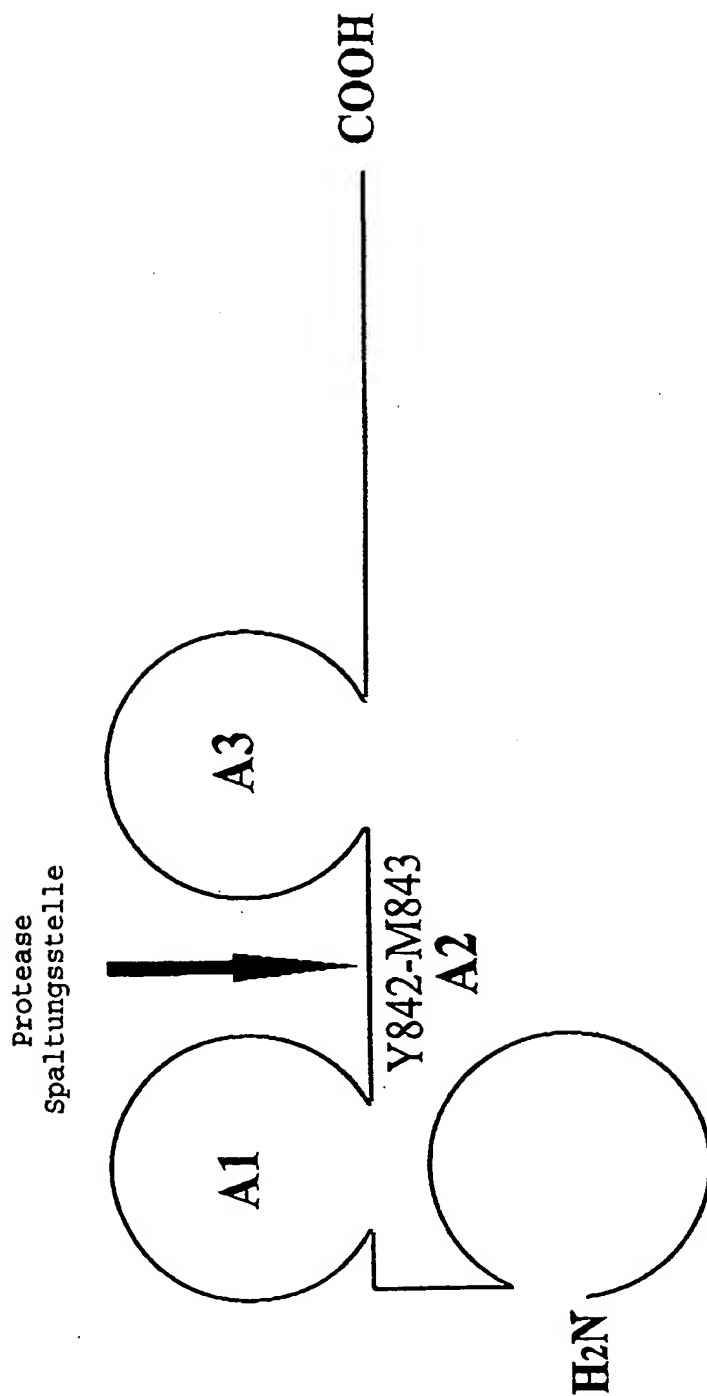


Fig. 3: vWF-Untereinheit mit Spaltungsstelle



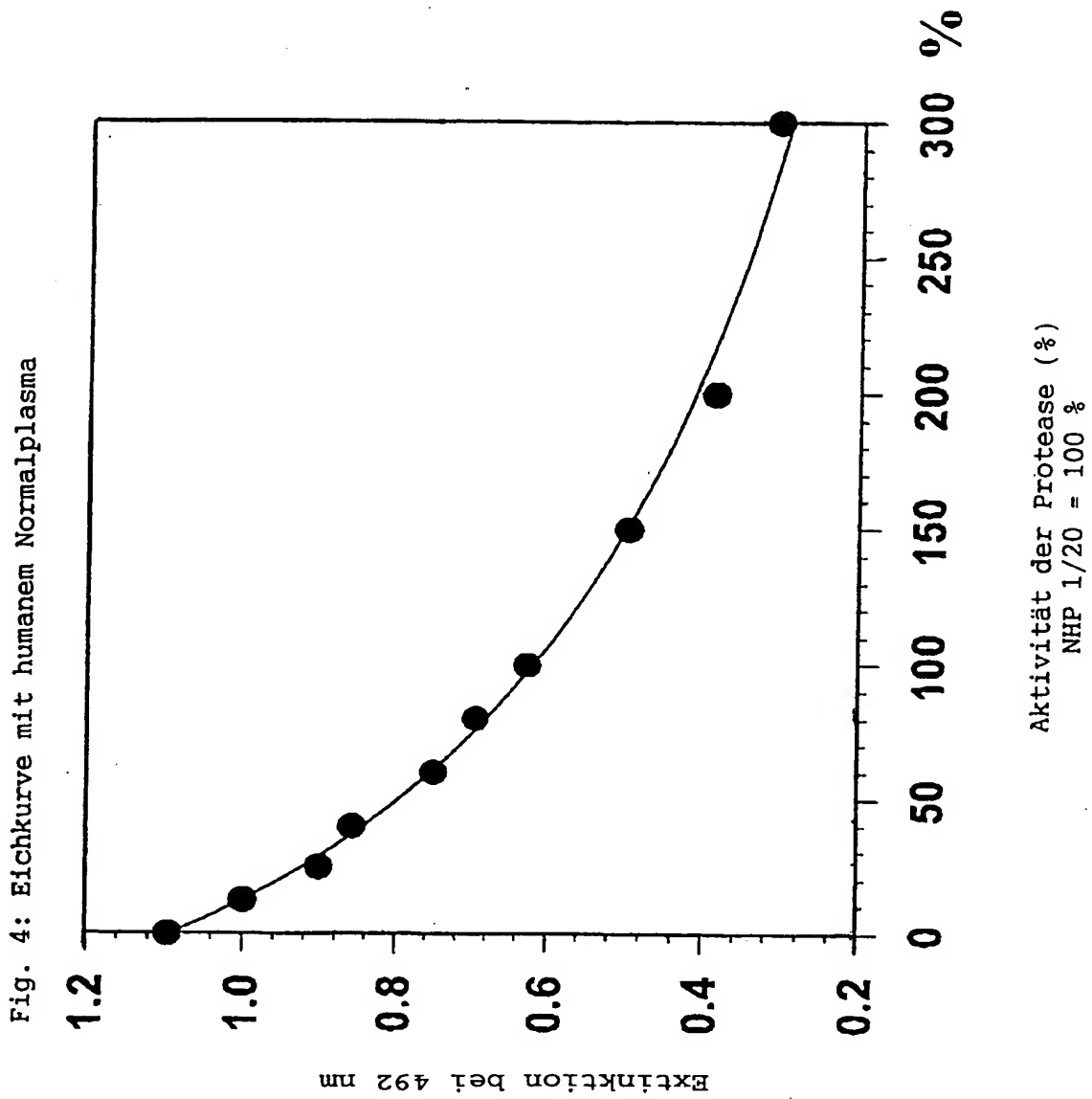


Fig. 5: Patienten mit hereditärer TPP

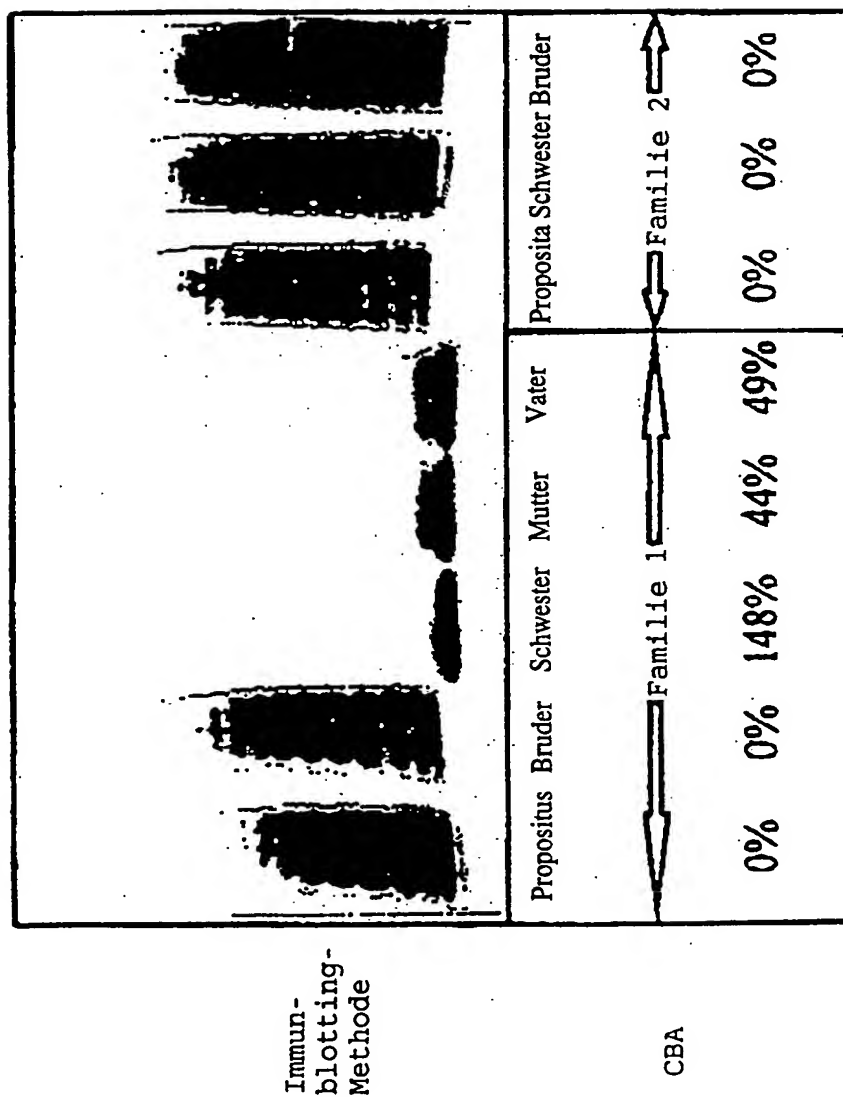
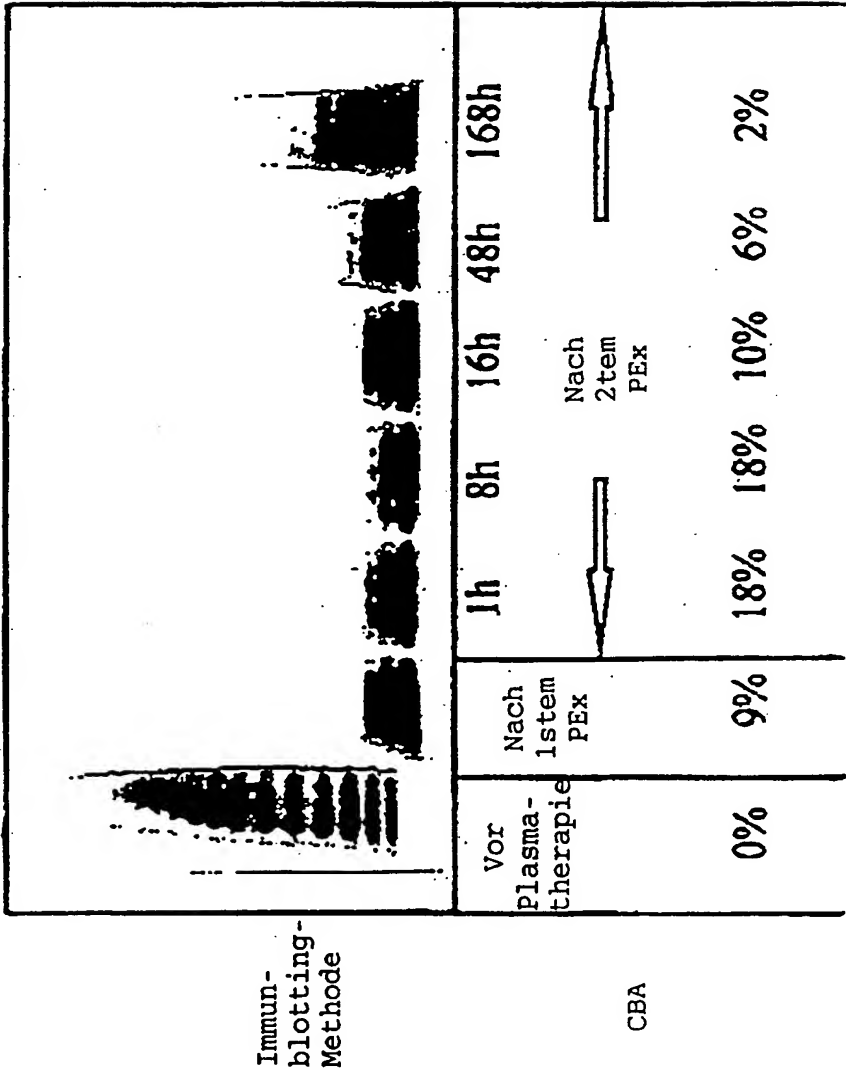
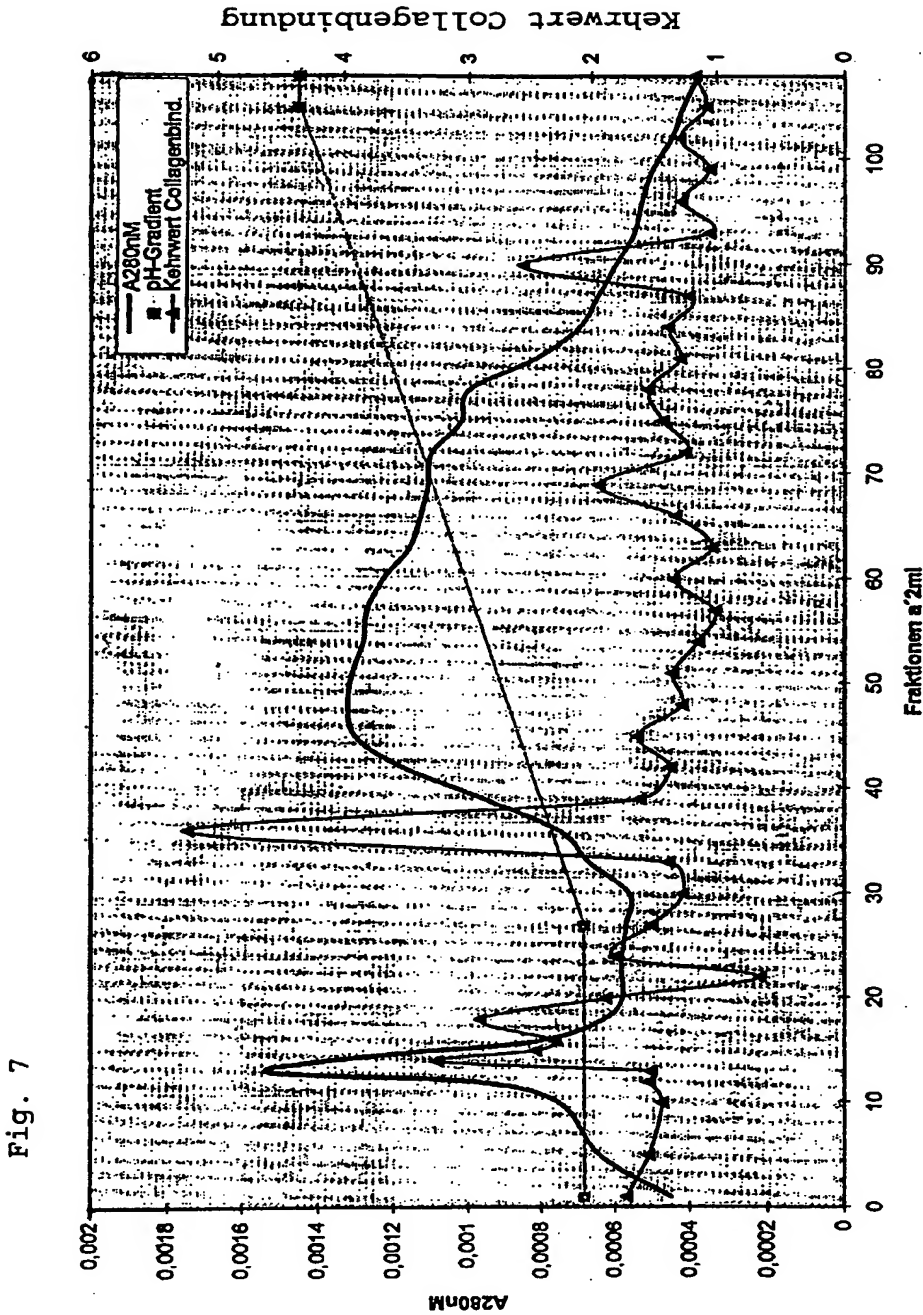


Fig. 6: Therapie monitoring eines Patienten mit schwerer TTP





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Patent Application No.
PCT/AT 00/00049

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/86 C12Q1/37

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FURLAN M ET AL: "PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PROTEASE FROM HUMAN PLASMA CLEAVING VON WILLIBRAND FACTOR TO FRAGMENTS PRODUCED BY IN VIVO PROTEOLYSIS" BLOOD, US, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, vol. 87, no. 10, 15 May 1996 (1996-05-15), pages 4223-4234, XP002042011 ISSN: 0006-4971 cited in the application the whole document	1-8
A	AT 403 853 B (IMMUNO AG) 25 June 1998 (1998-06-25) cited in the application the whole document	1-8
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 July 2000

Date of mailing of the international search report

26/07/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/AT 00/00049

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 97 41206 A (IMMUNO AG) 6 November 1997 (1997-11-06) claim 47 ----	1-8
P,X	GERRITSEN, H.E. ET AL.: "Assay of von Willebrand Factor (vWF)-cleaving Protease Based on Decreased Collagen Binding Affinity of Degraded vWF" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 82, November 1999 (1999-11), pages 1386-1389, XP000922765 the whole document ----	1-8
P,X	MANNUCCI, P.M.: "Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Simpler Diagnosis at last" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, vol. 82, November 1999 (1999-11), pages 1380-1381, XP000922655 the whole document ----	1-8
A	FURLAN, M. ET AL.: "Von Willebrand factor: molecular size and functional activity" ANNALS OF HEMATOLOGY, vol. 72, no. 6, June 1996 (1996-06), pages 341-348, XP000922763 page 344, column 1, paragraph 3 -column 2, paragraph 1 -----	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/AT 00/00049

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
AT 403853	B	25-06-1998	AT 119096 A	15-10-1997
			EP 0816852 A	07-01-1998
WO 9741206	A	06-11-1997	AT 404359 B	25-11-1998
			AT 404554 B	28-12-1998
			AT 76996 A	15-03-1998
			EP 0907724 A	14-04-1999
			US 6068838 A	30-05-2000
			AT 77096 A	15-05-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

in nationales Aktenzeichen

PCT/AT 00/00049

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 7 G01N33/86 C12Q1/37		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 7 G01N C12Q		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	FURLAN M ET AL: "PARTIAL PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A PROTEASE FROM HUMAN PLASMA CLEAVING VON WILLIBRAND FACTOR TO FRAGMENTS PRODUCED BY IN VIVO PROTEOLYSIS" BLOOD, US, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, Bd. 87, Nr. 10, 15. Mai 1996 (1996-05-15), Seiten 4223-4234, XP002042011 ISSN: 0006-4971 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-8
A	AT 403 853 B (IMMUNO AG) 25. Juni 1998 (1998-06-25) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-8
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		
<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie		
<ul style="list-style-type: none"> * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfindertätiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertätiger Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist 		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 11. Juli 2000		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 26/07/2000
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentkan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Bevollmächtigter Beauftragter Gundlach, B

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int.ionales Aktenzeichen

PCT/AT 00/00049

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 97 41206 A (IMMUNO AG) 6. November 1997 (1997-11-06) Anspruch 47 ----	1-8
P,X	GERRITSEN, H.E. ET AL.: "Assay of von Willebrand Factor (vWF)-cleaving Protease Based on Decreased Collagen Binding Affinity of Degraded vWF" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, Bd. 82, November 1999 (1999-11), Seiten 1386-1389, XP000922765 das ganze Dokument ----	1-8
P,X	MANNUCCI, P.M.: "Thrombotic Thrombocytopenic Purpura: A Simpler Diagnosis at last" THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS, Bd. 82, November 1999 (1999-11), Seiten 1380-1381, XP000922655 das ganze Dokument ----	1-8
A	FURLAN, M. ET AL.: "Von Willebrand factor: molecular size and functional activity" ANNALS OF HEMATOLOGY, Bd. 72, Nr. 6, Juni 1996 (1996-06), Seiten 341-348, XP000922763 Seite 344, Spalte 1, Absatz 3 -Spalte 2, Absatz 1 -----	1-8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 00/00049

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
AT 403853	B	25-06-1998	AT	119096 A	15-10-1997
			EP	0816852 A	07-01-1998
WO 9741206	A	06-11-1997	AT	404359 B	25-11-1998
			AT	404554 B	28-12-1998
			AT	76996 A	15-03-1998
			EP	0907724 A	14-04-1999
			US	6068838 A	30-05-2000
			AT	77096 A	15-05-1998

(12)

(21) 2 362 483

(22) 23.02.2000

(51) Int. Cl. 7: **G01N 33/86, C12Q 1/37**

(85) 23.08.2001

(86) PCT/AT00/00049

(87) WO00/50904

(30) GM 132/99 AT 25.02.1999

(71) **BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT,**
Industriestrasse 67
A-1221, VIENNA, XX (AT).

(72) **VARADI, KATALIN (AT).**

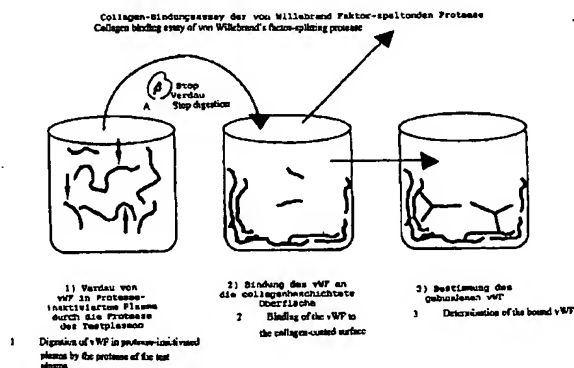
GERRITSEN, HELENA E. (CH).
SIEKMANN, JURGEN (AT).
FURLAN, MIHA (CH).
SCHWARZ, HANS-PETER (AT).
TURECEK, PETER (AT).
LAMMLE, BERNHARD (CH).

(74) **SIM & MCBURNEY**

(54) **KIT DE TEST POUR L'ANALYSE DE LA PROTEASE CLIVANT LE FACTEUR VIII**
(54) **TEST KIT FOR ANALYSING FACTOR VIII-SPLITTING PROTEASE**

(57)

The invention relates to a test kit for analysing the von Willebrand factor- splitting protease and for carrying out differential diagnosis between patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and patients with haemolytic- uraemic syndrome. Said test kit consists of a standard von Willebrand factor preparation which is free of von Willebrand factor- splitting activity, as a substrate for the von Willebrand factor- splitting activity in a sample or in the patient plasma, and a system for quantitatively determining the bonding of von Willebrand factor to collagen. The invention also relates to a method for detecting an acquired or congenital deficiency of von Willebrand factor- splitting protease.





Office de la Propriété
Intellectuelle
du Canada

Un organisme
d'Industrie Canada

Canadian
Intellectual Property
Office

An agency of
Industry Canada

62483 A1 2000/08/31

(21) 2 362 483

(12) DEMANDE DE BREVET CANADIEN
CANADIAN PATENT APPLICATION

(13) A1

(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2000/02/23
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2000/08/31
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2001/08/23
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: AT 00/00049
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: WO 00/50904
(30) Priorité/Priority: 1999/02/25 (GM 132/99) AT

(51) Cl.Int.⁷/Int.Cl.⁷ G01N 33/86, C12Q 1/37

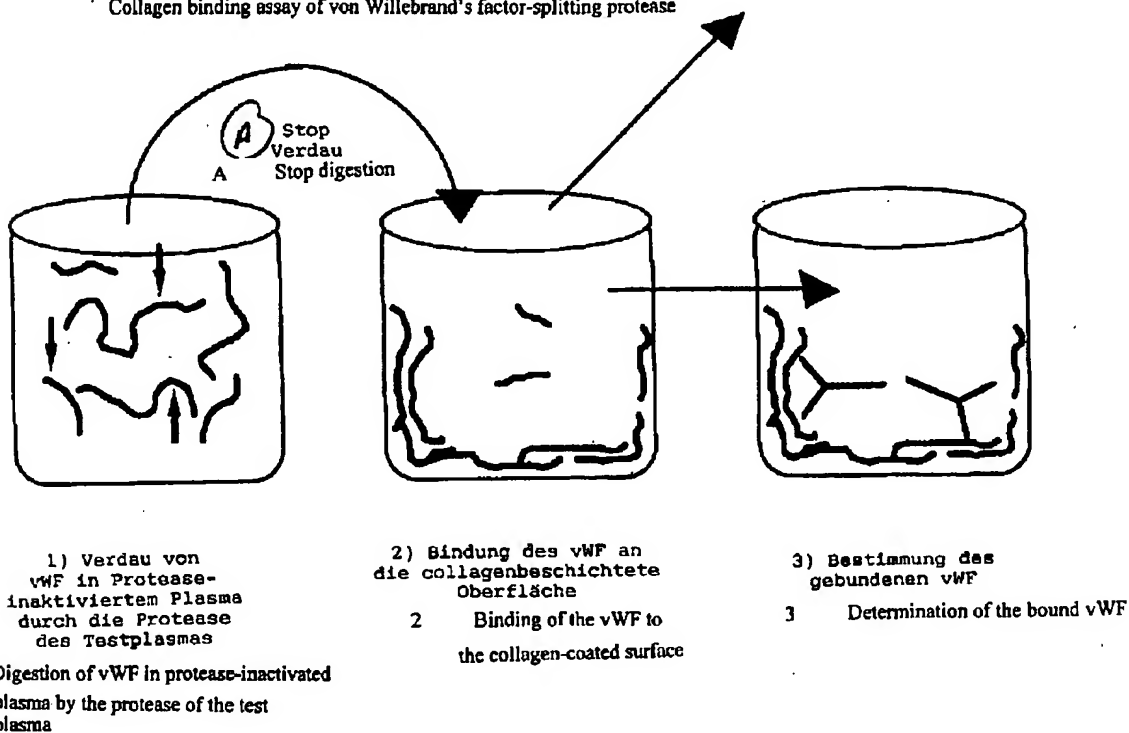
(71) Demandeur/Applicant:
BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT, AT

(72) Inventeurs/Inventors:
SCHWARZ, HANS-PETER, AT;
LAMMLE, BERNHARD, CH;
GERRITSEN, HELENA E., CH;
SIEKMANN, JURGEN, AT;
VARADI, KATALIN, AT;
TURECEK, PETER, AT;
FURLAN, MIHA, CH

(74) Agent: SIM & MCBURNEY

(54) Titre : KIT DE TEST POUR L'ANALYSE DE LA PROTEASE CLIVANT LE FACTEUR VIII
(54) Title: TEST KIT FOR ANALYSING FACTOR VIII-SPLITTING PROTEASE

Collagen-Bindungsassay der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease
Collagen binding assay of von Willebrand's factor-splitting protease



(57) Abrégé/Abstract:

The invention relates to a test kit for analysing the von Willebrand factor-splitting protease and for carrying out differential diagnosis between patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and patients with haemolytic-uraemic syndrome. Said

Canada

<http://opic.gc.ca> • Ottawa-Hull K1A 0C9 • <http://cipo.gc.ca>

OPIC • CIPO 191

OPIC



CIPO

(57) Abrégé(suite)/Abstract(continued):

test kit consists of a standard von Willebrand factor preparation which is free of von Willebrand factor-splitting activity, as a substrate for the von Willebrand factor-splitting activity in a sample or in the patient plasma, and a system for quantitatively determining the bonding of von Willebrand factor to collagen. The invention also relates to a method for detecting an acquired or congenital deficiency of von Willebrand factor-splitting protease.

ABSTRACT

The invention relates to a test kit for analyzing the von Willebrand factor-splitting protease and for carrying out differential diagnosis between patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and patients with haemolytic-uraemic syndrome. Said test kit consists of a standard von Willebrand factor preparation which is free of von Willebrand factor-splitting activity, as a substrate for the von Willebrand factor-splitting activity in a sample or in the patient plasma, and a system for quantitatively determining the bonding of von Willebrand factor to collagen. The invention also relates to a method for detecting an acquired or congenital deficiency of von Willebrand factor-splitting protease.

TEST KIT FOR ANALYZING FACTOR VIII-SPLITTING PROTEASE

The present invention relates to a test kit and a method for the determination of von Willebrand's factor-splitting protease as well as the application of the method to the differential diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP) and hemolytic uremic syndrome (HUS).

A deficiency of von Willebrand's factor-splitting protease was found in patients with TTP, whereas patients with hemolytic uremic syndrome (HUS) have normal activity of von Willebrand's factor-splitting protease. Except for the various cumbersome methods already described to date (Blood 1996; 87:4223), no method for determining the activity of von Willebrand's factor-splitting protease is currently available. A simple method of determination would facilitate distinguishing between TTP and HUS, and thus allow better monitoring of the therapy of patients with TTP.

It has now surprisingly been found that a test kit consisting of a von Willebrand's factor standard preparation that is free of von Willebrand's factor-splitting activity as a substrate for the von Willebrand's factor-splitting activity in a specimen or in the patient plasma, and a system for the quantitative determination of the binding of von Willebrand's factor to collagen makes possible for the first time in a simple manner the analysis of the von Willebrand's factor-splitting protease and the differential diagnosis between patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and patients with hemolytic uremic syndrome. The von Willebrand's factor standard preparation can in the process be inactivated specifically with regard to the von Willebrand's factor-splitting protease, but a general protease-inactivated von Willebrand's factor standard preparation can also be used.

According to a preferred embodiment of the test kit according to the invention, the collagen binding activity is quantitatively determined on immobilized avid collagen which is preferably bound to a microtiter plate.

In the process, it is favorable for the immobilized collagen to have a covalent bond.

Furthermore, it is advantageous when the avid collagen is a soluble human collagen that is broken down by enzymes.

Preferably, the von Willebrand's factor standard preparation is a human reference plasma in which the von Willebrand's factor-splitting protease activity is inactivated.

According to a further embodiment, it is provided that the von Willebrand's factor standard preparation is a recombinant von Willebrand's factor.

It is also convenient when the von Willebrand's factor standard preparation is a von Willebrand's factor dimer.

Furthermore, the present invention also relates to a method for the detection of an acquired or congenital deficiency of the von Willebrand's factor, in which a von Willebrand's factor standard preparation that is free of von Willebrand's factor-splitting activity as a substrate is brought into contact with the von Willebrand's factor-splitting activity of the patient plasma or dilutions of same, and after incubation the residual von Willebrand's factor is quantitatively detected through its binding properties to collagen.

The attached figures show the test principle according to the invention and the application to the diagnosis of patient plasma. The agreement of the complicated SDS agarose gel electrophoretic qualification with subsequent immune blotting with the quantitative method of the collagen binding assay (CBA) according to the invention is also represented in the attached figures.

According to the invention, dilutions of patient and normal plasma were activated with barium, and undiluted vWF substrate was added. As a substrate, a protease-inactivated plasma was used. After 2 h digestion in the presence of urea, the reaction was stopped and the incubation mixture was put on an ELISA plate that had been coated with collagen. The long vWF multimers bind very strongly to the collagen, the small molecules hardly or not at all. The supernatant is then discarded and the vWF molecules that were bound to the collagen can be detected by means of generally known methods of the state of the art, for example, by staining using peroxidase-labeled antibodies.

The present invention will now be explained in more detail with reference to the attached figures.

Shown are:

Figure 1, the principle of the collagen binding test according to the invention,

Figure 2, the action of the protease with vWF-splitting activity,

Figure 3, the action of the protease with vWF-splitting activity on the vWF subunit,

Figure 4, the test calibration,

Figure 5, the determination of the vWF-splitting protease in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura,

Figure 6, the determination of the vWF-splitting protease in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura during therapeutic treatment, and

Figure 7, the quantitative determination of the vWF-splitting protease in purified plasma fractions.

In the test according to the invention (Figure 1), the different affinities of the vWF multimers of various lengths are exploited. The long multimers have a very high affinity to collagen whereas the small molecules have very little or no affinity.

vWF consists of multimers with different lengths of the same subunit. The subunits are each bound together at the carboxy and amino termini by disulfide bridges (Figure 2). Each subunit can be split at tyrosine 842-methionine 843 by the vWF protease (Figure 3).

Under these conditions a calibration curve was established with different normal plasma dilutions (Figure 4). On the Y axis, the extinction is plotted at 492 nm, and on the X axis, the normal plasma dilutions. It is assumed that a dilution of normal plasma of 1/20 corresponds to 100% activity. The more vWF-splitting protease present in the mixture, the greater the vWF is digested and the less it can bind to collagen, and thus the smaller the extinction.

Presented in Figure 5 are the examinations of two families whose members suffer from hereditary TTP. Shown above is the immune blotting method, and below are the values that were obtained with the collagen binding assay (CBA) according to the invention. On the far left is the propositus, who is homozygous deficient in vWF-splitting protease. Next comes the brother, also homozygous-deficient, the sister who is normal, and both parents who must be homozygous. Wherever strong digestion of the vWF is indicated, the CBA according to the invention shows a value of 100%; where the substrate was not digested, it was also not possible to detect any activity in the CBA according to the invention. On the right are members of the same family, all of whom are homozygous deficient.

Furthermore, plasma specimens of a patient with hereditary TTP were examined during therapy with FFP (Figure 6). Above, the immune blotting method can again be seen, and below, the values that were obtained with the CBA according to the invention. On the far left, a plasma specimen is listed that was taken before therapy. The other specimens were taken after a first and a second plasma exchange. Both in the immune blotting method as well as in the collagen binding assay according to the invention, an increase of the activity can be observed after the first exchange, a further increase after the second, and afterwards, a reduction of the activity.

From these results it can be concluded that it is possible, using the collagen binding assay according to the invention, to simply and quickly measure the activity of the vWF-splitting protease. Thereby, the diagnosis and therapy monitoring of patients with TTP can be facilitated.

The advantage of the method according to the invention is the possibility for quantitative assessment, and the ability to perform it in a simpler and quicker manner, which is of critical significance in the acute diagnosis of life-threatening disease pictures. A particularly advantageous embodiment of the test according to the invention uses the collagen binding assay according to AT 403 853 for the quantitative determination of the protease substrate of von Willebrand's factor.

Another application of the present invention consists in the quantitative determination of von Willebrand's factor-splitting protease in the purification and characterization as therapeutic plasma fraction, or for quality control of whole plasma used in therapy. This is explained in more detail by means of the following example (see Figure 7).

von Willebrand's factor-splitting protease (multimerase) was purified in part according to AT 404 359. For further chromatographic purification, the multimerase preparation was applied to a column filled with Fractogel® TSK AF-orange (Merck), and eluted with a buffer gradient of pH 5.5-8.5 in a Tris buffer (10 mM Tris, 10 mM Na₃ citrate, 150 mM NaCl). In the fractions, the UV absorption at 280 nm (total protein) and the collagen binding activity of a von Willebrand's factor standard after incubation with the fractions according to the invention were measured. The reciprocal value of the collagen binding activity was entered into the elution diagram and indicates that, aside from a portion of the protease activity that is located in the column run-through (fraction 10-20), the majority of the activity could be eluted between fraction 33 and 38.

Claims

1. Test kit for the analysis of von Willebrand's factor-splitting protease and for differential diagnosis between patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and patients with hemolytic uremic syndrome, consisting of a von Willebrand's factor standard preparation that is free of von Willebrand's factor-splitting activity as substrate for the von Willebrand's factor-splitting activity in a specimen or in the patient plasma, and a system for the quantitative determination of the binding of von Willebrand's factor to collagen.
2. Test kit according to Claim 1, characterized in that the quantitative determination of the collagen binding activity occurs on immobilized avid collagen that is present preferably on a microtiter plate.
3. Test kit according to Claim 2, characterized in that the immobilized collagen has a covalent bond.
4. Test kit according to Claim 2 or 3, characterized in that the avid collagen is soluble human collagen that is broken down by enzymes.
5. Test kit according to one of Claims 1-4, characterized in that the von Willebrand's factor standard preparation is a human reference plasma in which the von Willebrand's factor-splitting protease activity is inactivated.
6. Test kit according to one of Claims 1-4, characterized in that the von Willebrand's factor standard preparation is a recombinant von Willebrand's factor.
7. Test kit according to Claims 1-4, characterized in that the von Willebrand's factor standard preparation is a von Willebrand's factor dimer.

Replacement pages

Claims

1. Use of a test kit containing a von Willebrand's factor standard preparation that is free of von Willebrand's factor-splitting activity as substrate for the von Willebrand's factor-splitting activity in a specimen or in the patient plasma, and a system for the quantitative determination of the binding of von Willebrand's factor to collagen.

2. Use according to Claim 1 for the analysis of von Willebrand's factor-splitting protease and for differential diagnosis between patients with thrombotic thrombocytopenic purpura and patients with hemolytic uremic syndrome.

3. Test kit containing a von Willebrand's factor standard preparation that is free of von Willebrand's factor-splitting activity as substrate for the von Willebrand's factor-splitting activity in a specimen or in the patient plasma, and a system for the quantitative determination of the binding of von Willebrand's factor to collagen.

4. Test kit according to Claim 3, characterized in that the quantitative determination of the collagen binding activity occurs on immobilized avid collagen that is present preferably on a microtiter plate.

5. Test kit according to Claim 3 or 4, characterized in that the immobilized collagen has a covalent bond.

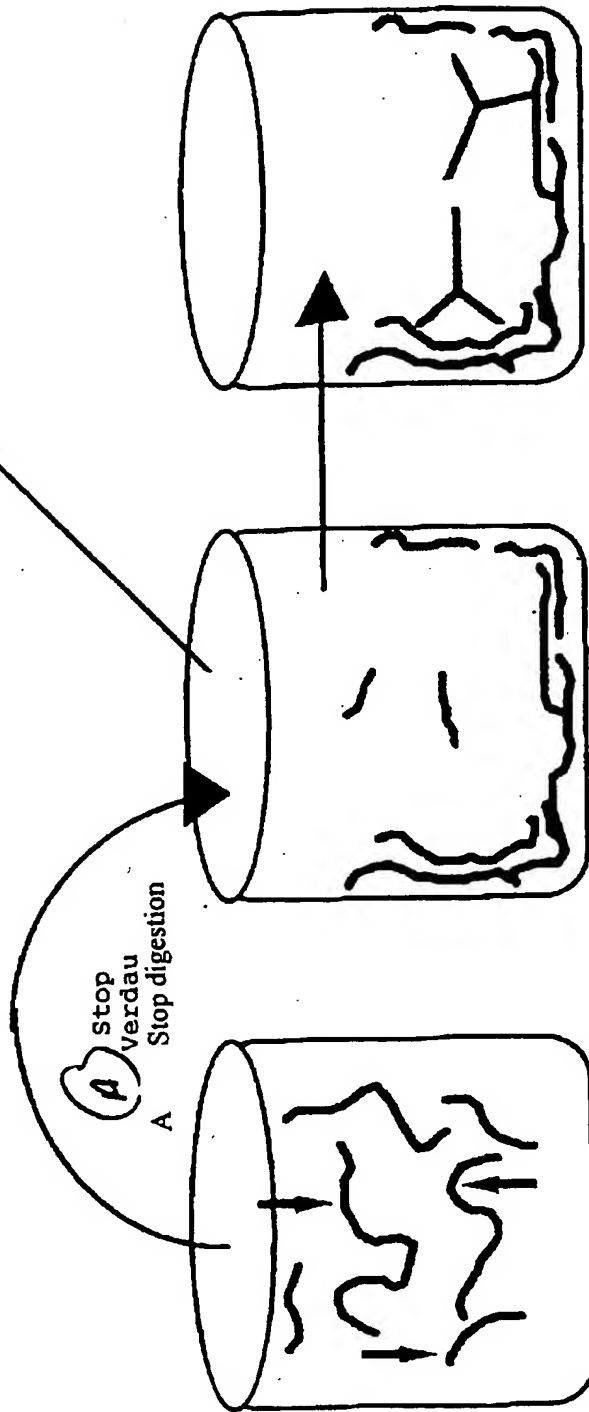
6. Test kit according to one of Claims 3-5, characterized in that the avid collagen is soluble human collagen that is broken down by enzymes.

7. Test kit according to one of Claims 2-6, characterized in that the von Willebrand's factor standard preparation is a recombinant von Willebrand's factor.

8. Test kit according to Claims 2-6, characterized in that the von Willebrand's factor standard preparation is a von Willebrand's factor dimer.

9. Method for the detection of an acquired or congenital deficiency of von Willebrand's factor-splitting protease characterized in that a von Willebrand's factor standard preparation that is free of von Willebrand's factor-splitting activity, as a substrate, is brought into contact with the von Willebrand's factor-splitting activity of the patient plasma or dilutions of same, and after incubation, the residual von Willebrand's factor is quantitatively detected by its binding properties to collagen.

Fig. 1: Collagen-Bindungsassay der von Willebrand Faktor-spaltenden Protease
 Figure 1: Collagen binding assay of von Willebrand's factor-splitting protease



1) Verdau von
vWF in Protease-
inaktiviertem Plasma
durch die Protease
des Testplasmas

1. Digestion of vWF in protease-inactivated
plasma by the protease of the test
plasma

2) Bindung des vWF an
die collagenbeschichtete
Oberfläche

2. Binding of the vWF to
the collagen-coated surface

3) Bestimmung des
gebundenen vWF

3. Determination of the bound vWF

Fig. 2: Spaltung der vWF-Multimeren
Figure 2: Splitting of the vWF multimers

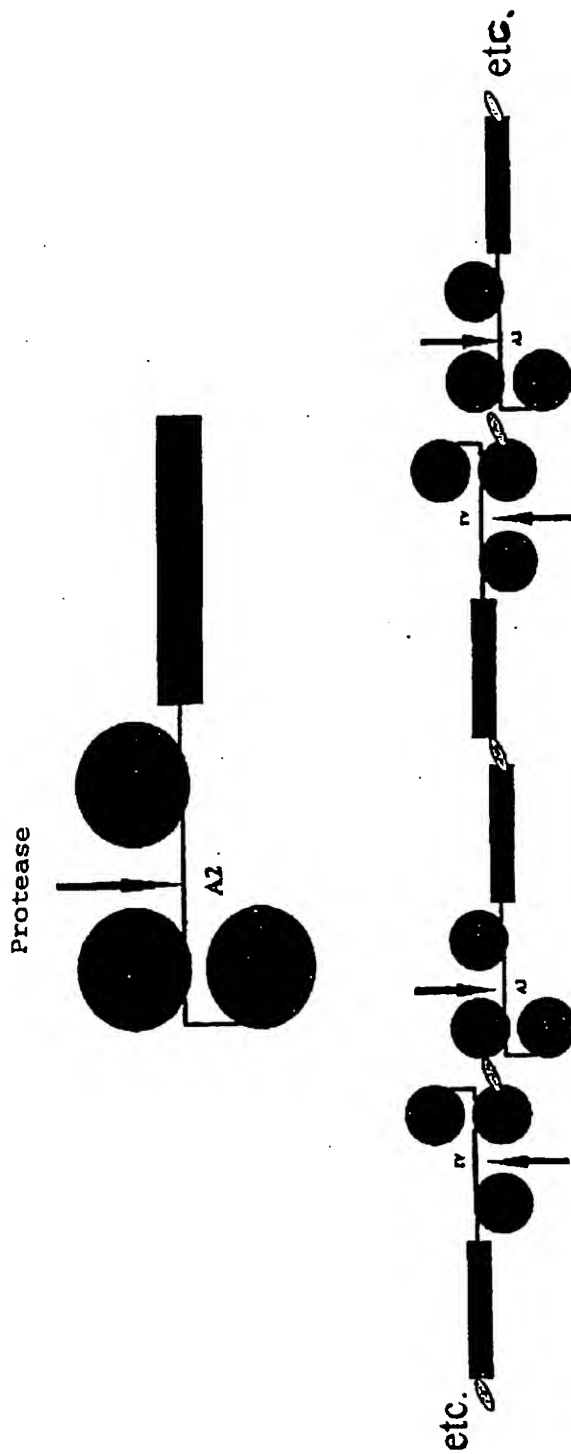
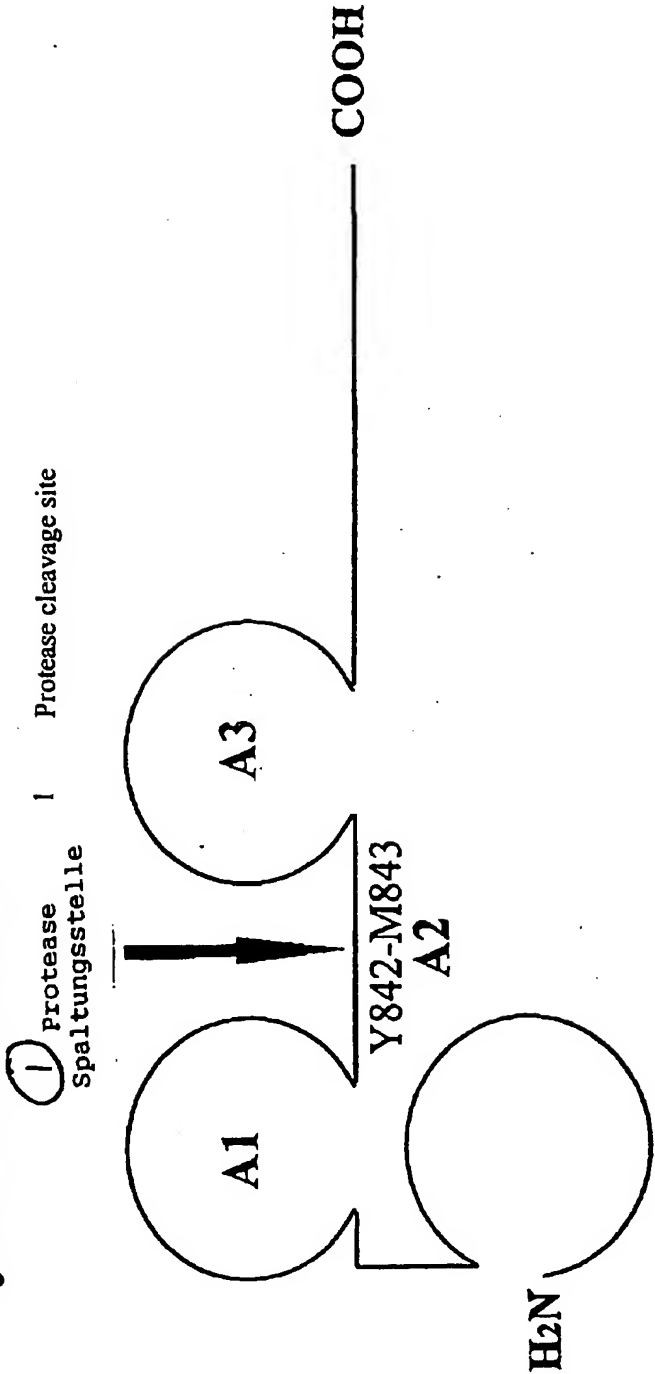


Fig. 3: vWF-Untereinheit mit Spaltungsstelle

Figure 3: vWF subunit with cleavage site



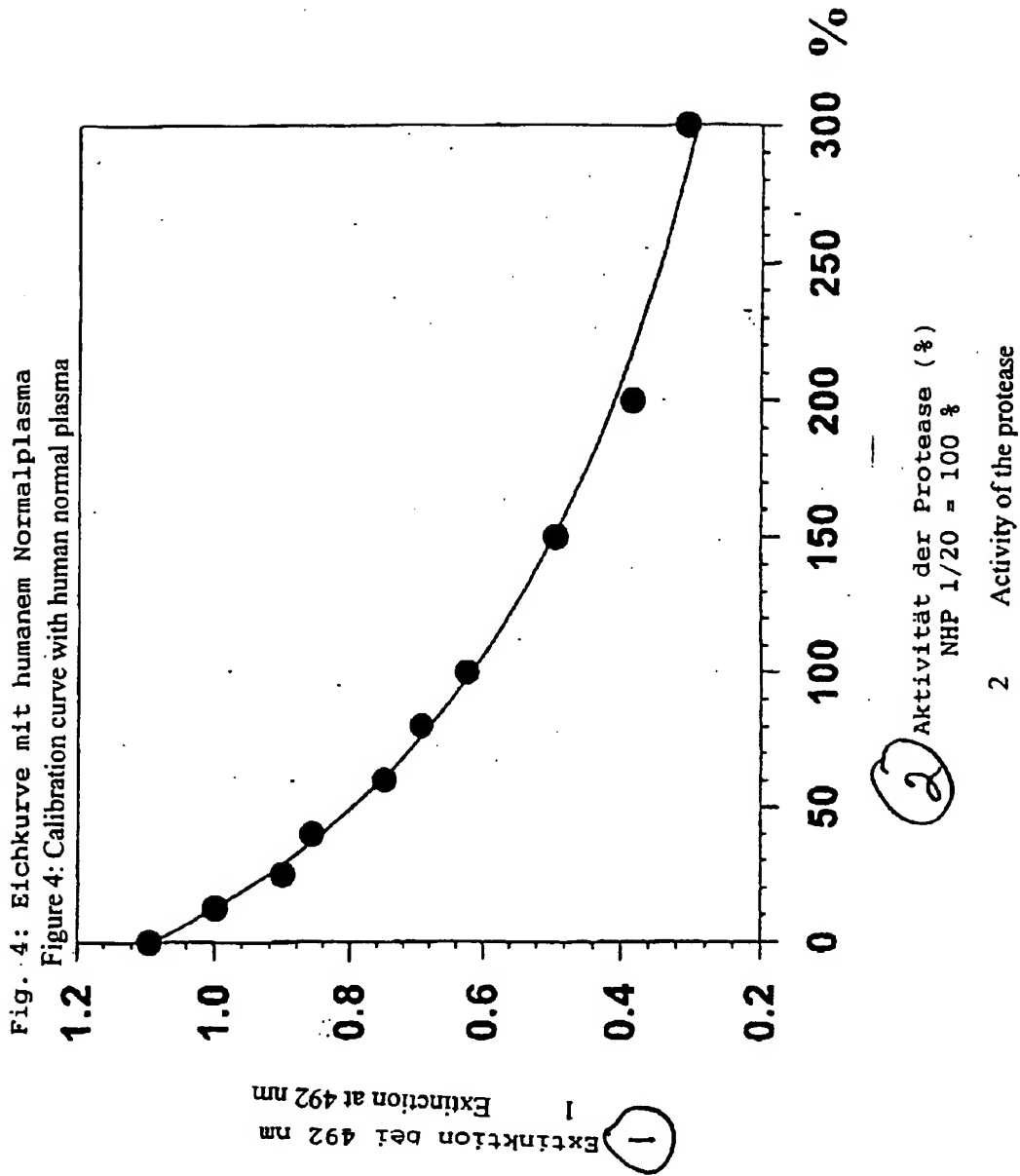


Fig. 5: Patienten mit hereditärer TPP

Figure 5: Patients with hereditary TPP

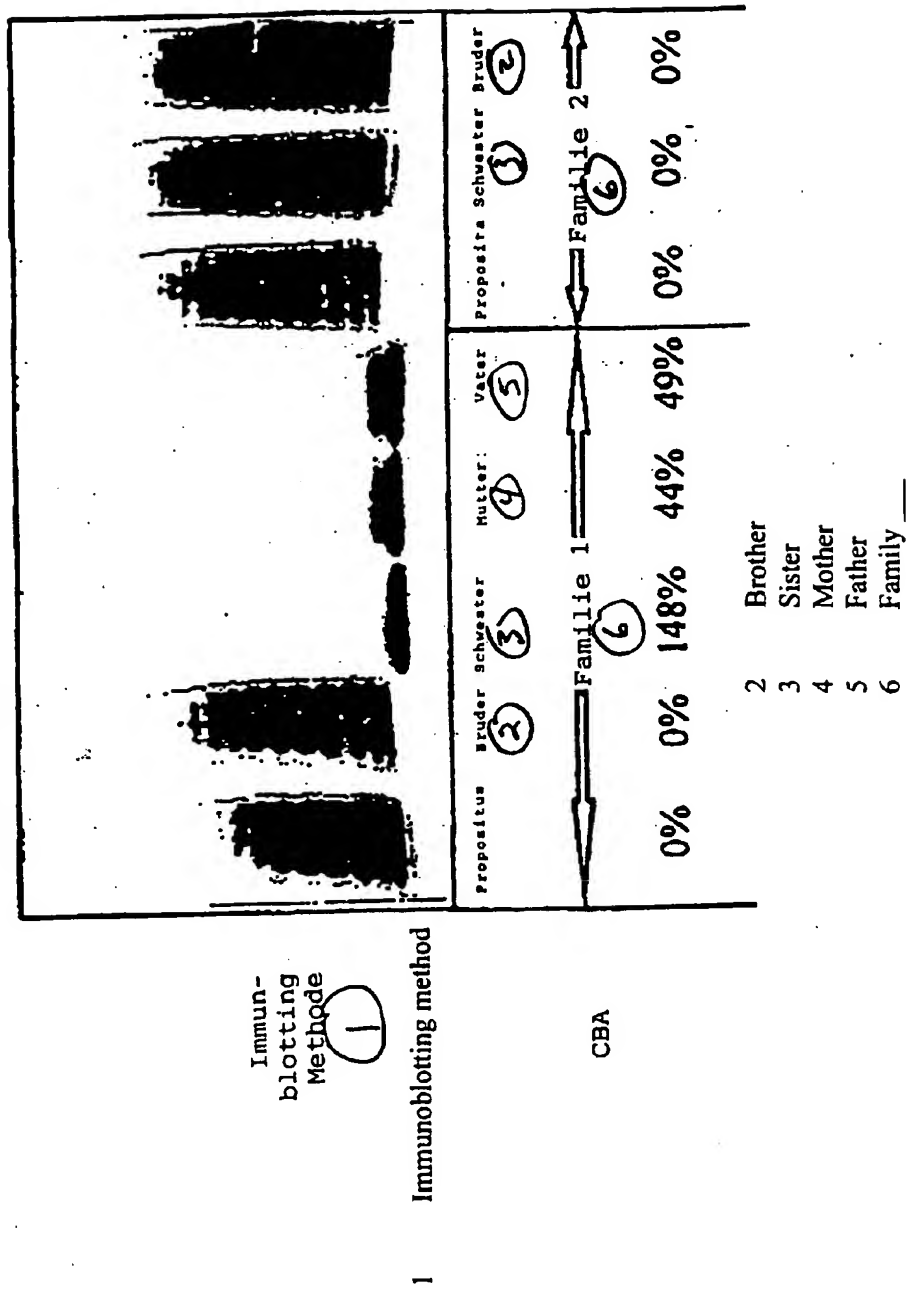
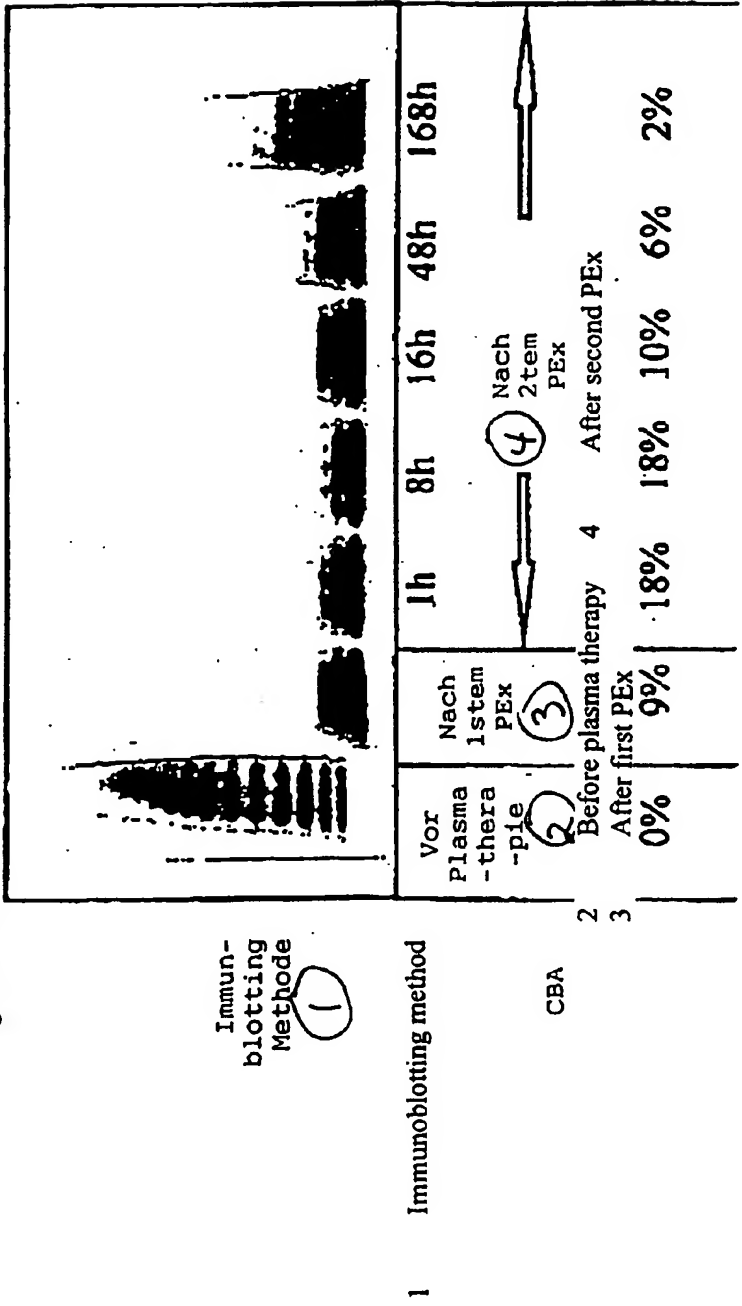


Fig. 6: Therapie monitoring eines Patienten mit schwerer TTP
Figure 6: Therapy monitoring of a patient with severe TTP



7/7

Reciprocal value for collagen binding

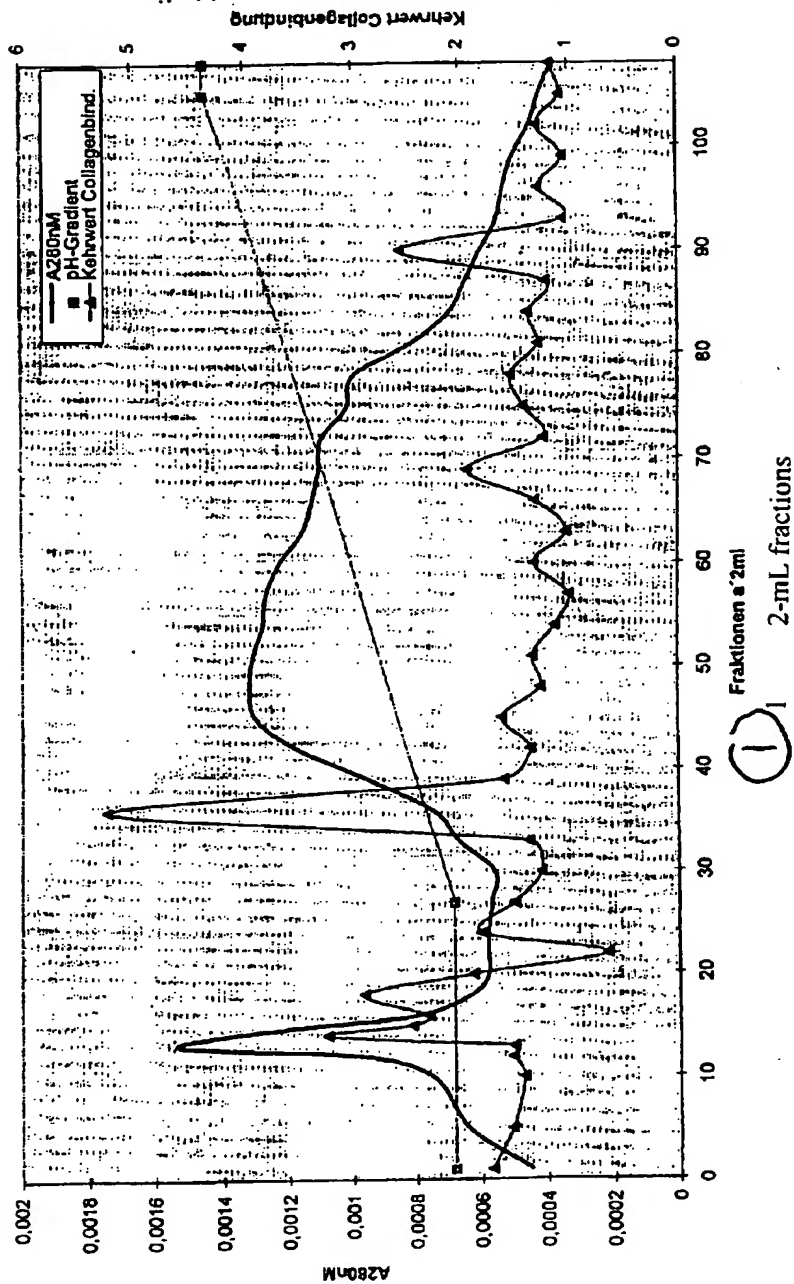


Figure 7: Reciprocal value for collagen binding

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.